

**Є.В. Шороп,
А.С. Тимченко**

КРИТЕРІЇ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ЗА ЗМІНАМИ РОЗМІРІВ ТРОМБОЦИТІВ

*ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»
вул. М. Берлінського, 12, Київ, 04060, Україна
SI «Institute of haematology and transfusiology NAMS Ukraine»
M. Berlinskogo st., 12, Kyiv, 04060, Ukraine
e-mail: kmh2010@i.ua*

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, бластний криз, тромбоцити, автоматичний гематологічний аналізатор, тромбоцитарні індекси, морфометрія
Key words: chronic myeloid leukemia, blast crisis, platelets, automatic hematology analyzer, platelet indices, morphometry

Реферат. Критерии прогнозирования течения хронической миелоидной лейкемии по изменениям размеров тромбоцитов. Шороп Е.В., Тимченко А.С. С целью выявления специфических изменений размеров тромбоцитов у больных хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) и оценки возможности их использования в качестве прогностических критериев прогрессии заболевания обследована периферическая кровь 62 пациентов с ХМЛ. Исследование осуществлялось с помощью автоматического гематологического анализатора и методом компьютерного анализа изображений на микрофотографиях мазков периферической крови. У больных ХМЛ было выявлено увеличение среднего объема тромбоцитов (параметр MPV) и процента больших тромбоцитов (параметр P-LCR). Измерение тромбоцитов на цифровых микрофотографиях, осуществленное параллельно, выявило повышение вариабельности их размеров. Анализ характеристических кривых специфичность/чувствительность показал возможность использования коэффициента вариации и стандартного отклонения натурального логарифма площадей тромбоцитов в мазках периферической крови в качестве прогностического фактора прогрессирования ХМЛ в фазу бластного криза.

Abstract. Prognostic criteria of chronic myeloid leukemia by changes platelets sizes. Shorop Y.V., Tymchenko A.S. In order to identify specific changes in the size of platelets in patients with chronic myeloid leukemia (CML) and assess possibility of their use as prognostic criteria for disease progression peripheral blood of 62 patients with CML was examined. The study was carried out by an automatic hematology analyzer and method of computer image analysis on micrographs of peripheral blood smears. CML patients showed an increase in mean platelet volume (parametr MPV) and the percentage of large platelets (parameter P-LCR). Measurement of platelet digital micrographs, carried out in parallel, showed an increase of variability of their size. Analysis of characteristic curves of the specificity/sensitivity showed the possibility of using the coefficient of variation and standard deviation of the natural logarithm of platelets in areas of the peripheral blood smear as a predictor of progression of CML in blast crisis phase.

Автоматичні прилади, які ввійшли в практику клініко-діагностичних лабораторій, дозволили прискорити виконання аналізів крові та об'єктивувати результати. Крім того, сучасні гематологічні аналізатори надали змогу визначити низку параметрів, що характеризують розміри формених елементів крові, та зокрема тромбоцитів. При дослідженні периферичної крові (ПК) автоматичні гематологічні аналізатори здатні визначити об'єм декількох тисяч тромбоцитів і за їхніми значеннями вирахувати ряд показників, що характеризують розміри цих клітин. Серед таких показників найбільше поширення отримали середнє значення об'єму (параметр MPV, mean platelets volume), широта розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW, platelets distribution width) та відсоток великих тромбоцитів (P-LCR, platelets large cell ratio) [1].

У теперішній час у світі надзвичайно активно проводяться дослідження щодо можливості використання розмірних показників тромбоцитів для діагностики й прогнозування різних захворювань та патологічних станів організму, пов'язаних з неопластичними, запальними процесами, гіпоксією, порушеннями згортання крові, кровообігу й ендокринної регуляції [5, 7]. Поряд з тим недостатньо вивченими залишаються зміни розмірних характеристик тромбоцитів при злоякісних захворюваннях крові. Одним з таких захворювань є хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ). Вона виникає внаслідок реципрокної хромосомної мутації t(9;22), в результаті чого утворюється химерний ген BCR/ABL. Продукт вказаного гену, завдяки своїй тирозинкіназній активності, активує ряд білків-адаптерів та сигнальних шляхів (с-Мус,

Raf-1, PI3K-AKT, PkD2-NFkB, JAK-STAT5, RAS-MAPK та ін.), внаслідок чого в клітинах підсилюються процеси проліферації, пригнічуються механізми запрограмованої клітинної смерті й контролю цілісності генетичного матеріалу. Це проявляється неконтрольованою проліферацією клітин-попередників мієлоїдного ряду з частковим порушенням їхнього дозрівання, що супроводжується збільшенням у крові гранулоцитарних лейкоцитів та тромбоцитів і появою осередків кровотворення поза кістковим мозком [6]. Захворювання має безперервно прогресуючий характер і проходить декілька фаз, які не мають чітко обмежених границь. Деякий час симптоми мають сталий характер, що характеризується як хронічна фаза, але при відсутності ефективної терапії захворювання прогресує та переходить в термінальну стадію - бластний криз (БК). Про прогресування ХМЛ, що знаменує собою перехідний період (фаза акселерації), свідчать зміни клінічних та лабораторних показників: збільшення розмірів селезінки, кількості лейкоцитів, кількості тромбоцитів вище $1\ 000\ 000 \times 10^9/\text{л}$ або зменшення менше $100 \times 10^9/\text{л}$, які не залежать від терапії, що проводиться, збільшення кількості мієлобластів і мієлоцитів у крові або кістковому мозку, поява додаткових хромосомних аномалій у пухлинних клітинах [4]. Хоча нині основою діагностики ХМЛ є виявлення патогномонічної хромосомної мутації t(9;22) або гена, що при цьому утворюється, на тлі відповідних клініко-гематологічних змін, показниками прогресування захворювання є результати клінічного обстеження та гематологічні показники. Це робить актуальним пошук та розробку додаткових діагностичних та прогностичних критеріїв перебігу хвороби.

Результати досліджень розмірів тромбоцитів при ХМЛ, представлені в сучасній літературі, нечисленні. Вважається, що при цьому захворюванні, як і при більшості інших нозологій групи хронічних мієлопроліферативних новоутворень, спостерігається збільшення розмірів тромбоцитів. При дослідженні за допомогою автоматичного аналізатора це проявляється підвищенням параметрів MPV, PDW, P-LCR [8]. Хоча, згідно з результатами більш ранніх досліджень, у хворих спостерігалось зменшення розмірів тромбоцитів [9]. Не визначеним також залишається значення змін величини показників розмірів тромбоцитів для діагностики ХМЛ, що вказує на актуальність теми дослідження.

Мета роботи — визначення типових змін величини показників, що характеризують розміри тромбоцитів, у хворих на ХМЛ і оцінка

можливості їхнього використання як прогностичних критеріїв переходу захворювання у фазу бластного кризу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження була ПК 47 хворих зі встановленим діагнозом ХМЛ, які знаходились на диспансерному спостереженні в консультативній поліклініці (завідувач - лікар вищої категорії М.Ф. Онищенко) або проходили лікування у відділенні захворювань системи крові ДУ "ІГТ НАМН" (завідувач професор Н.М. Третяк), серед них 39 мали хронічну фазу, а 8 — фазу акселерації. Крім того, обстежено 15 пацієнтів з ХМЛ у фазі БК до початку поліхіміотерапії, які знаходились на стаціонарному лікуванні. Контрольну групу становили 83 зразки ПК відносно здорових осіб. У кожного пацієнта отримана згода на використання його крові та результатів клініко-лабораторного дослідження для науково-дослідної роботи.

Кількість тромбоцитів та їхні розміри визначали за допомогою автоматичного аналізатора крові SYSMEX KX-21N (Японія). Параметри MPV були представлені у фемтолітрах (фл, $1\text{ фл} = 10^{-15}\text{ л}$), PDW та P-LCR – у відсотках.

Паралельно за цифровими мікрофотографіями, отриманими методом світлової мікроскопії, визначали розмір тромбоцитів. Для цього в мазках ПК, пофарбованих за Паппенгеймом, за допомогою світлового мікроскопа Leica-DME (Німеччина) з цифровою фотонасадкою фотографували поля зору, що містили ці клітини. За мікрофотографіями вираховували кількість точок (пікселів), які утворювали зображення тромбоцитів. Отримані значення площ для переводу в квадратні мікрометри множили на масштабний коефіцієнт, що був вирахований при вимірюванні мікрооб'єктів стандартного розміру. Таким чином вимірювали площу 500-1 500 тромбоцитів. Для характеристики розмірів тромбоцитів вираховували середнє арифметичне значення та моду (значення, що зустрічається найчастіше в зразку) їхніх площ. Для характеристики однорідності розмірів тромбоцитів вираховували стандартні відхилення та коефіцієнти варіації площ цих клітин у зразках.

Як відомо, криві статистичного розподілу тромбоцитів ПК за розмірами мають складний асиметричний характер із зсувом у бік великих значень (рис. 1). Для наближення розподілу до нормального, згідно з рекомендаціями наукової літератури [8, 9], вираховували натуральний логарифм площі кожного тромбоцита й для них - середнє арифметичне значення та стандартне відхилення.

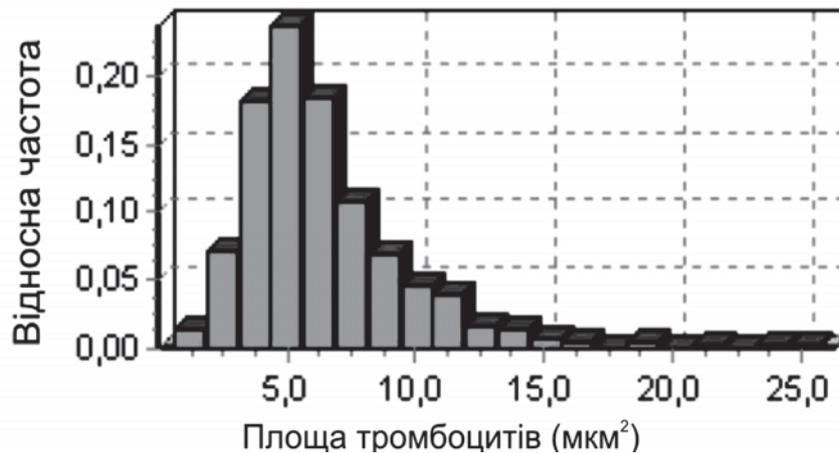


Рис. 1. Приклад частотної гістограми розподілу тромбоцитів периферичної крові здорової людини за площею

Статистичну значущість різниці між показниками розмірів тромбоцитів у групах хворих на ХМЛ та здоровими особами визначали за параметричним t-критерієм Стьюдента. Достовірними вважали різницю при $p < 0,05$. Для оцінки потенційної можливості використання досліджуваних параметрів з діагностичною метою будували характеристичні криві специфічність/чутливість для цих показників (так званий ROC-аналіз). Як критерії діагностичної ефективності показників вираховували площу під характеристичними кривими (AUC, area under the curve).

Значення площ в умовних одиницях під характеристичними кривими коливаються від 0,5 (тест не має діагностичного значення) до 1,0 (ідеальний діагностичний тест). Значення від 0,9 до 1,0 відповідає відмінній якості тесту, 0,8-0,9 – дуже хороший, 0,7-0,8 задовільний, 0,6-0,7 – середній, 0,5-0,6 – незадовільний. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми для обробки результатів медико-біологічних досліджень MedCalc (MedCalc Software bvba).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними лабораторних досліджень у ПК хворих на ХМЛ спостерігалось вірогідне ($p < 0,05$) збільшення кількості тромбоцитів – $(565,7 \pm 50,5) \times 10^9/\text{л}$ порівняно з показниками здорових осіб – $(234,3 \pm 8,4) \times 10^9/\text{л}$. У фазі БК кількість тромбоцитів варіювала в широких межах від тромбоцитопенії ($45,0 \times 10^9/\text{л}$) до гіпертромбоцитозу ($1534,0 \times 10^9/\text{л}$) і в середньому становила $(454,3 \pm 160,4) \times 10^9/\text{л}$, що вірогідно вище величини показників здорових осіб. При статистичній обробці значень розмірних параметрів тромбоцитів у хворих на ХМЛ було виявлено значуще підвищення MPV та P-LCR, а в пацієнтів у фазі БК – збільшення параметрів

P-LCR порівняно з показниками здорових осіб. Такі зміни можуть вказувати на збільшення розміру тромбоцитів ПК у пацієнтів з ХМЛ. Статистично значущих відмінностей розмірних показників тромбоцитів, отриманих за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора, між групами хворих на ХМЛ з пацієнтами в фазі БК виявлено не було (табл.).

Згідно з результатами статистичного аналізу показників, що характеризують розміри тромбоцитів, визначеними за цифровими мікрофотографіями, у ПК пацієнтів з ХМЛ більшість тромбоцитів мали менші розміри, ніж у здорових, на що вказують нижчі значення моди площ. Поряд з тим, середні значення площ та натурального логарифму площ не мали достовірної різниці з показниками здорових осіб, що можна пояснити наявністю в крові тромбоцитів з розмірами, значно більшими за середні. Така тенденція до збільшення розмірів тромбоцитів проявлялася також у підвищенні середніх значень їхніх площ при прогресуванні захворювання у фазу бластного кризу. Іншою характерною зміною тромбоцитів у хворих на ХМЛ була висока варіабельність їхніх розмірів, яка проявлялася в підвищенні показників стандартного відхилення площ, коефіцієнту варіації площ, а також стандартного відхилення натурального логарифму їхніх площ у мазках периферичної крові.

Практичне значення можуть мати результати порівняльного дослідження характеристик розмірів тромбоцитів між групами хворих на ХМЛ та хворих на ХМЛ в фазі БК. У пацієнтів з ХМЛ у фазі БК визначалося достовірне збільшення середнього значення, коефіцієнту варіації та стандартного відхилення площ, а також стандартного відхилення натурального логарифму

площ тромбоцитів у мазках. Такі зміни вказують на те, що тромбоцити ПК при переході захворювання в фазу БК у хворих на ХМЛ збільшують свої розміри і стають більш не-

однорідними. Зазначена тенденція є відображенням наростання морфологічних порушень тромбоцитів внаслідок прогресування захворювання.

Показники розмірів тромбоцитів у хворих на ХМЛ та оцінка ефективності їх використання для діагностики переходу захворювання в фазу бластного кризу методом характеристичних кривих специфічність/чутливість (M±m)

Показники, розмірів тромбоцитів	Середні значення показників у хворих на ХМЛ			Площі під характеристичними кривими, AUC±m
	хворі на ХМЛ	хворі на ХМЛ у фазі БК	контроль	
MPV	(9,9±0,1) фл*	(10,0±0,4)фл	(9,5±0,1) фл	0,55±0,13
PDW	(12,6±0,4)%	(14,1±1,8)%	(12,5±0,4)%	0,58±0,12
P-LCR	(25,3±1,1)%*	(27,5±2,6)%*	(22,3±0,9)%	0,59±0,12
Середнє арифметичне площ	(7,6±0,3)мкм ^{2**}	(10,4±2,7)мкм ²	(8,0±0,4)мкм ²	0,51±0,13
Середнє арифметичне натурального логарифму площ	1,86±0,04	1,83±0,17	1,93±0,05	0,60±0,13
Мода площ	(5,4±0,2)мкм ^{2*}	(4,7±0,8)мкм ²	(6,3±0,4)мкм ²	0,67±0,14
Стандартне відхилення площ	(5,8±0,3)мкм ^{2***}	(11,2±3,8) мкм ^{2*}	(3,7±0,1)мкм ²	0,60±0,14
Стандартне відхилення натурального логарифму площ	0,52±0,01***	0,68±0,07*	0,43±0,01	0,76±0,10***
Коефіцієнт варіації площ	(74,8±3,1)%***	(97,1±9,9)%*	(48,3±1,6)%	0,72±0,10***

Примітки: * p<0,05 порівняно з показниками здорових осіб; ** p<0,05 між показниками хворих на ХМЛ і хворих у стадії бластного кризу; *** p<0,05 між значеннями площ під характеристичними кривими показника та неефективного тесту (0,5).

Для оцінки потенційної можливості використання параметрів, що характеризують розміри тромбоцитів, для діагностики переходу ХМЛ у фазу БК було здійснено статистичні дослідження методом побудови характеристичних кривих розрахункової чутливості та специфічності названих показників. Критеріями діагностичної цінності досліджуваних параметрів були показники площ під цими кривими. Площі під характеристичними кривими для показників

коефіцієнту варіації та стандартного відхилення натурального логарифму площ тромбоцитів у мазках ПК становили 0,72 та 0,76, що відповідає задовільній ефективності діагностичного тесту, та мали достовірні відмінності від 0,5 (неефективний діагностичний тест). Це дозволяє рекомендувати використання їх як додаткові діагностичні та прогностичні критерії переходу ХМЛ у фазу БК. Характеристичні криві зазначених показників наведено на рисунку 2.

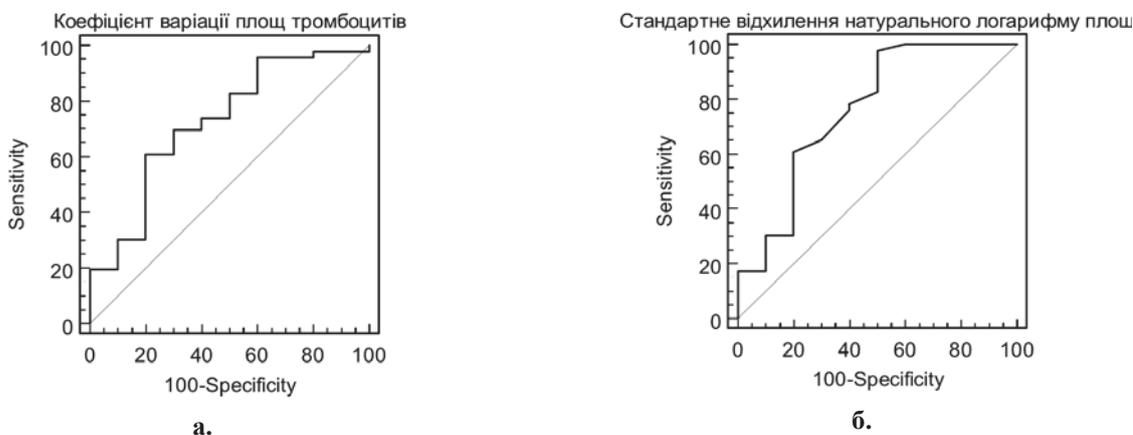


Рис. 2. Характеристичні криві специфічність/чутливість коефіцієнту варіації площ тромбоцитів (а) та стандартного відхилення натурального логарифму площ тромбоцитів (б) в мазках ПК при їх використанні для прогнозування переходу ХМЛ у фазу бластного кризу

ВИСНОВКИ

1. За результатами досліджень розмірів тромбоцитів з використанням автоматичного гематологічного аналізатора виявлено, що для хворих на ХМЛ характерним є підвищення середніх розмірів тромбоцитів ПК та відсотку великих форм, яке проявляється високими значеннями параметрів MPV та P-LCR порівняно з показниками здорових осіб.

2. При аналізі розмірів тромбоцитів за цифровими мікрофотографіями мазків ПК виявлено, що в середньому розміри тромбоцитів у хворих на ХМЛ не мають вірогідних відмінностей від

показників здорових осіб, але характеризуються більшою варіабельністю.

3. Тромбоцити хворих на ХМЛ у фазі БК порівняно з пацієнтами у хронічній фазі характеризуються більшою варіабельністю розмірів у мазках ПК, що, зокрема, проявляється більшим коефіцієнтом варіації їхніх площ та стандартного відхилення натурального логарифму площ. Підвищення названих показників може бути використане як додатковий критерій прогресування захворювання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Клетки крови — современные технологии их анализа / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров [и др.]. — Москва: Триада-Фарм, 2002. — 200 с.
2. Лисенко Д.А. Тромбоцитоз при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях: клініко-морфологічні аспекти / Д.А. Лисенко, Є.В. Шороп, Л.М. Ісакова // Укр. мед. часопис. — 2010. — Т. 76, № 2. — С. 109-111.
3. Луговская С.А. Возможности гематологических анализаторов / С.А. Луговская // Клинич. лаб. диагностика. — 2007. — № 2. — С. 6-9.
4. Третьак Н.М. Гематология / Н.М. Третьак: навч. посібник. — Київ: Зовнішня торгівля, 2005. — 240 с.
5. Can mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio be used as a diagnostic marker for sepsis and systemic inflammatory response syndrome? / S. Ates, H. Oksuz, B. Dogu [et al.] // Saudi Med. J. — 2015. — Vol. 36, N 10. — P. 1186-1190.

6. Machova-Polakova K. Role of Epigenetics in Chronic Myeloid Leukemia / K. Machova-Polakova, J. Koblihova, T. Stopka // Curr. Hematol. Malig. Rep. — 2013. — Vol. 8, N 1. — P. 28-36.
7. Mean platelet volume could be a possible biomarker for papillary thyroid carcinomas / S. Baldane, SH. Ipekci, M. Sozen, L. Kebapcilar // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. — 2015. — Vol. 16, N 7. — P. 2671-2674.
8. Normal platelet counts mask abnormal thrombopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia / K. Yan, B. Ding, J. Huang [et al.] // Oncol. Lett. — 2015. — Vol. 10, N 4. — P. 2390-2394.
9. Platelet defects in chronic myeloproliferative disorders / A. Raszeja-Specht, A. Skibowska, J. Kabata, A. Hellmann // Acta Haematol. Pol. — 1994. — Vol. 25, N 3. — P. 253-260.

REFERENCES

1. Kozinets G, Pogorelov V, Shmarov D, Boev S., Sazonov V. [Blood cells - modern technology analysis]. Moscow: Triada-Farm. 2002;200. Russian.
2. Lysenko D., Shorop Y., Isakova L. [Thrombocytosis with chronic myeloproliferative disorders: clinical and morphological aspects]. Ukrain'skiy medichniy chasopis. 2010;76(2):109-11. Ukrainian.
3. Lugovskaya S. [Features of hematology analyzers]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2007;(2):6-9. Russian.
4. Tretyak N. [Hematology: Manual.]. Kiev: "Zovnishnya torgivlya". 2005;240. Ukrainian.
5. Ates S, Oksuz H, Dogu B, Bozkus F, Ucmak H, Yanit F Can mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio be used as a diagnostic marker for sepsis and systemic inflammatory response syndrome?. Saudi Med J. 2015;36(10):1186-90.

6. Machova Polakova K, Koblihova J, Stopka T. Role of Epigenetics in Chronic Myeloid Leukemia. Curr Hematol Malig Rep. 2013;8(1):28-36.
7. Baldane S, Ipekci SH, Sozen M, Kebapcilar L. Mean platelet volume could be a possible biomarker for papillary thyroid carcinomas. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(7):2671-4.
8. Yan K, Ding B, Huang J, Dai Y, Xiong S, Zhai Z. Normal platelet counts mask abnormal thrombopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia. Oncol Lett. 2015;10(4):2390-4.
9. Raszeja-Specht A, Skibowska A, Kabata J, Hellmann A. [Platelet defects in chronic myeloproliferative disorders]. Acta Haematol Pol. 1994;25(3):253-60. Polish.

Стаття надійшла до редакції
09.12.2015